



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΣΚΗΣΗ, ΕΡΓΟΣΠΡΟΜΕΤΡΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η επίδραση της συμπληρωματικής λήψης λιποϊκού οξέος στην
οξειδοαναγωγική κατάσταση κατά την άσκηση**

Μηνά Ευαγγελία

Καθηγήτρια Φυσικής Αγωγής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τζιαμούρτας Αθανάσιος, Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων Καθηγητής

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

Στάγκος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

ΛΑΡΙΣΑ 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE
POSTGRADUATE STUDY PROGRAMME
EXERCISE, ERGOSPIROMETRY AND REHABILITATION



The effect of lipoic acid supplementation on redox status during exercise

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΞΩΦΥΛΛΟ.....	1
ΣΕΛΙΔΑ ΤΙΤΛΟΥ.....	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	7
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
2. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
2.1. Το ένζυμο G6PD	13
2.1.1. Έλλειψη του G6PD	15
2.1.1.1. Έλλειψη του G6PD και υγεία.....	16
2.2. Οξειδοαναγωγικό σύστημα και άσκηση	17
2.2.1. Έλλειψη του G6PD και άσκηση.....	18
2.3. Διατροφικές αντιοξειδωτικές ουσίες.....	19
2.3.1. Λιποϊκό οξύ	21

3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
3.1. Σκοπός	24
3.2. Υλικό και Μέθοδος	24
3.3. Αποτελέσματα	30
3.4. Συζήτηση	33
3.5. Συμπεράσματα.....	35
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	36
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	43
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	44
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	47
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV	50

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Σωματομετρικά χαρακτηριστικά και σωματική σύσταση πριν και μετά τη λήψη συμπληρώματος λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.....31

Πίνακας 2. Φυσιολογικές παράμετροι και απόδοση κατά την άσκηση πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.....31

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Συγκέντρωση ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) μετά τη λήψη λιποϊκού οξέος (LA) και μετά τη λήψη εικονικού σκευάσματος (PL) σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD.....	32
Σχήμα 2. Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) μετά τη λήψη λιποϊκού οξέος (LA) και μετά τη λήψη εικονικού σκευάσματος (PL) σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD	32

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Η γλυκόζη μετατρέπεται σε πεντόζες, με την πρώτη αντίδραση να καταλύεται από την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)	14
Εικόνα 2. Πρόκληση οξειδωτικού στρες λόγω ανισορροπίας μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και των αντιοξειδωτικών του οργανισμού.....	15
Εικόνα 3. Η κατανομή της έλλειψης του G6PD παγκοσμίως (Cappellini & Fiorelli, 2008).....	16
Εικόνα 4. Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και η παραγωγή γλουταθειόνης (Προσαρμογή από Mehta et al., 2000)	21
Εικόνα 5. Η οξειδωμένη (α-λιποϊκό οξύ) και η ανηγμένη (δυσδρο-λιποϊκό οξύ) μορφή του λιποϊκού οξέος	23

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επειδή καμιά εργασία δεν αποτελεί μοναχική δραστηριότητα, αλλά σ' αυτή αποτυπώνεται το αποτέλεσμα όλης της πορείας που διανύθηκε για τη διεκπεραίωση της όλης διαδικασίας, οφείλω ως ένδειξη ελάχιστης ευγνωμοσύνης, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, αρχικά στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Αθανάσιο Τζιαμούρτα για την αμέριστη βοήθεια και τις συνεχείς υποδείξεις καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Αποτέλεσε πιστό αρωγό και μου παρείχε ουσιαστική καθοδήγηση, ενώ επίσης μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα.

Ένα ακόμη ιδιαίτερο ευχαριστώ στη διδάκτορα κ. Καλλιόπη Γεωργακούλη, η οποία μου παρείχε ερευνητικό υλικό και επιπλέον καθοδήγηση. Ιδιαίτερη σημαντική ήταν η γνωστική συμπαράσταση και η ηθική υποστήριξή της που μου προσέφερε και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των βιοχημικών παραμέτρων. Εδώ θέλω να ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτορα κ. Βασιλική Λάσχου, για την υπομονή της και την υποστήριξή της κατά την ανάλυση των βιοχημικών παραμέτρων.

Χάρη στο ήθος τους και την εν γένει ευγένειά και των δυο τους, ενισχύθηκε η αυτοπεποίθησή μου, ώστε να αναλάβω ένα τέτοιο εγχείρημα.

Ξεχωριστές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Δημήτρη Κουρέτα, ο οποίος με βοήθησε στον προσανατολισμό της εργασίας και της συνεργασίας μου με την ομάδα τους κ. Τζιαμούρτα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συμμετέχοντες στη μελέτη, καθώς χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί.

Τέλος, το θερμότερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που με εφοδίασε με τα απαραίτητα θεμέλια και μου παρείχε κίνητρα για να ακολουθήσω τα «θέλω» μου προκειμένου να εκπληρώσω τα όνειρά μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να ερευνηθεί κατά πόσο η λήψη α-λιποϊκού οξέος (ΛΟ) μπορεί να μεταβάλλει δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD). Στη μελέτη συμμετείχαν 8 άτομα με έλλειψη του G6PD, τα οποία έλαβαν συμπλήρωμα ΛΟ (600 mg/ημέρα) για 4 εβδομάδες και εικονικό σκεύασμα για άλλες 4 εβδομάδες, σε τυχαία σειρά. Μεταξύ των δυο καταστάσεων υπήρξε περίοδος έκπλυσης 4 εβδομάδων, ενώ ο ερευνητής δεν γνώριζε κάθε φορά σε ποια κατάσταση συμμετέχει ο κάθε συμμετέχοντας (διπλά τυφλή). Οι συμμετέχοντες έλαβαν μέρος σε μια δοκιμασία άσκησης μέχρι εξάντλησης σε δαπεδοεργόμετρο πριν και μετά από κάθε κατάσταση, ενώ σε κάθε δοκιμασία έγινε λήψη αίματος πριν, αμέσως μετά και 1 ώρα μετά την άσκηση. Μετρήθηκαν οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια στον ορό. Δεν φάνηκε καμία σημαντική επίδραση της λήψης ΛΟ στην απόδοση κατά την άσκηση ούτε στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκαν. Η μελέτη περισσότερων δεικτών με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων θα έδιναν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα.

Λέξεις κλειδιά: Άσκηση, απόδοση, οξειδωτικό στρες, αντιοξειδωτικό, συμπλήρωμα.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to investigate whether α -lipoic acid (LA) intake can change indices of blood redox status in individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. Eight individuals with G6PD deficiency participated in the study, which received LA supplement (600 mg/day) for 4 weeks and placebo for another 4 weeks, in random order. Between the two conditions, there was a 4-week wash-out period, while the investigator did not know in which condition each participant was in (double blind). Participants underwent an exercise trial till exhaustion on a treadmill before and after each condition, while in each trial blood samples were collected before, immediately after and 1 hour after exercise. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls were measured in serum. No significant effect of LA intake on exercise performance or indices of redox status was found. Examination of more indices with a larger sample size would provide a better understanding.

Key words: *Exercise, performance, oxidative stress, antioxidant, supplement.*

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο για τα κύτταρα (Leopold et al., 2001) και ιδιαίτερα για τα ερυθροκύτταρα (Schuurman et al., 2009). Σε ερυθροκύτταρα με μειωμένη δραστηριότητα G6PD, προκαλείται διαταραχή στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, κι επομένως οξειδωτικό στρες (Chan et al., 1999). Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι οι εκφυλιστικές ασθένειες (Ho et al., 2007). Επιπρόσθετα, λόγω της μειωμένης ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας που φαίνεται ότι υπάρχει και σε άλλα είδη κυττάρων, όπως τα μυϊκά κύτταρα, έχει γίνει η υπόθεση ότι αυτή η έλλειψη μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες στην απόδοση κατά την άσκηση και στην αποκατάσταση, όπου εμπλέκεται το οξειδοαναγωγικό σύστημα προκειμένου να επέλθουν οι προσαρμογές του οργανισμού.

Η έλλειψη του G6PD αποτελεί μια από τις πιο συχνές ενζυμικές διαταραχές. Υπολογίζεται ότι περισσότερα από 400 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως την έχουν (Mehta et al., 2000; Turan, 2006), ενώ και στην Ελλάδα υπάρχει μεγάλη διάδοση της έλλειψης, με το ποσοστό να κυμαίνεται περίπου στο 3.2% του πληθυσμού. Ειδικότερα στη Θεσσαλία θεωρείται ότι το ποσοστό ανέρχεται στο 10% (Missiou-Tsagaraki, 1991).

Επομένως, γίνεται εμφανές ότι ένα σημαντικό μέρος του ελληνικού πληθυσμού επηρεάζεται από την έλλειψη του G6PD. Έτσι, προκειμένου να προληφθούν ή και να αντιμετωπιστούν παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες σε αυτά τα άτομα, είναι αναγκαίο να βρεθούν εκείνοι οι ασφαλείς και εύκολοι τρόποι που θα έχουν ένα προστατευτικό αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό, ειδικά τα τελευταία χρόνια, έχουν ξεκινήσει να μελετώνται οι πιθανές ευεργετικές δράσεις διάφορων αντιοξειδωτικών ουσιών στο οξειδοαναγωγικό σύστημα ατόμων με έλλειψη του G6PD.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι διατροφικές αντιοξειδωτικές ουσίες που μπορούν να αυξήσουν την συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), μιας εκ των πλέον σημαντικών αντιοξειδωτικών ουσιών του οργανισμού για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες (Kidd, 1997). Καθώς τα επίπεδα της GSH στα κύτταρα ατόμων με έλλειψη του G6PD είναι χαμηλά, τέτοιες διατροφικές αντιοξειδωτικές ουσίες μπορεί να επιφέρουν βελτιώσεις στο οξειδοαναγωγικό σύστημα των κυττάρων. Το λιποϊκό οξύ (συγκεκριμένα το α-λιποϊκό οξύ) αποτελεί μια τέτοια διατροφική αντιοξειδωτική ουσία

που φαίνεται να βελτιώνει τα επίπεδα της GSH σε αυτά τα άτομα (Georgakouli et al., 2013).

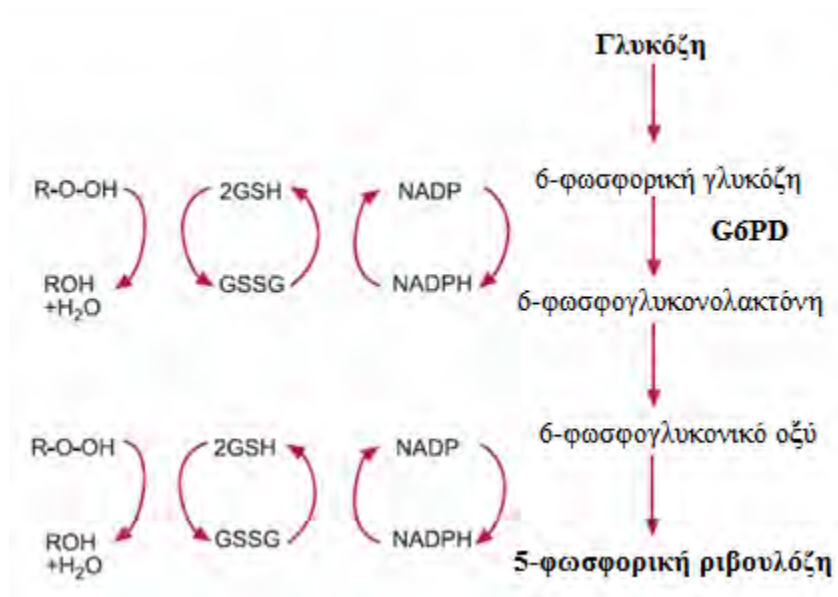
Στην παρούσα εργασία γίνεται μια προσπάθεια να διαπιστωθεί εάν η συμπληρωματική χορήγηση λιποϊκού οξέος μπορεί να βελτιώσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του G6PD και ταυτόχρονα να βελτιώσει την απόδοση κατά την άσκηση.

2. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Το ένζυμο G6PD

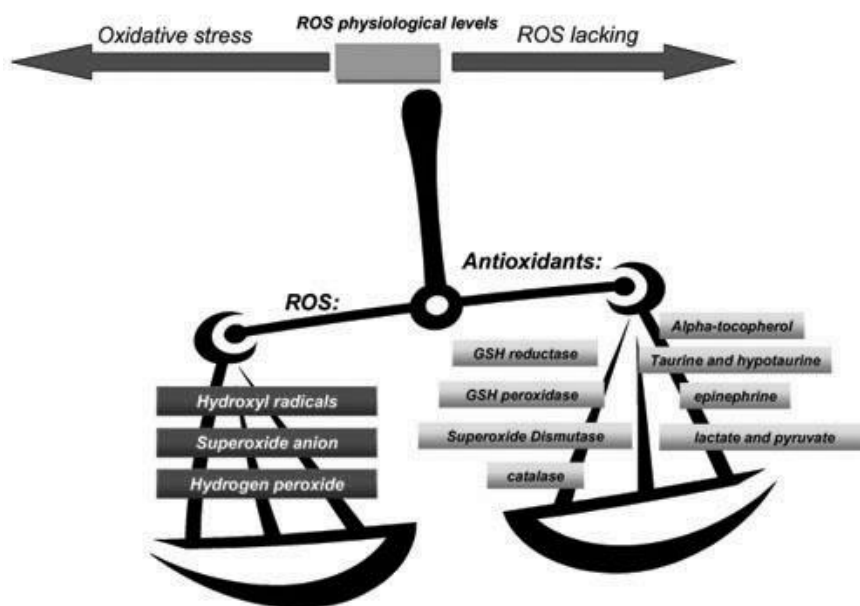
Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) είναι ένα σημαντικό ένζυμο του μεταβολισμού. Είναι το περιοριστικό ένζυμο που καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και οδηγεί στη σύνθεση της ριβόζης και τη μετατροπή του NADP στην ανηγμένη του μορφή, το NADPH (Leopold et al., 2001; Frank et al., 2005). Το NADPH προστατεύει από την οξειδωτική βλάβη, καθώς συμβάλλει στη σύνθεση ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), μιας εκ των σημαντικότερων αντιοξειδωτικών ουσιών (Gaetani et al., 1996). Η GSH εξουδετερώνει τα βλαβερά αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) ενώ ταυτόχρονα μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Προκειμένου να συντεθεί εκ νέου GSH, κι επομένως να αποκατασταθεί η οξειδοαναγωγική ισορροπία μέσα στο κύτταρο, η γλουταθειόνη ανακυκλώνεται από την αναγωγή της GSSG, όπου το NADPH συμμετέχει ως αναγωγικό ισοδύναμο (Leopold et al., 2001).

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι το G6PD αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο των εμπύρηνων κύτταρων (Leopold et al., 2001). Ειδικά όσον αφορά τα ερυθροκύτταρα, λόγω της έλλειψης μιτοχονδρίων αποτελεί τη μοναδική πηγή NADPH (Schuurman et al., 2009). Επομένως, μειωμένη δραστηριότητα του G6PD, η οποία γίνεται ιδιαίτερα έκδηλη στα ερυθροκύτταρα, μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή NADPH με συνέπεια τη διαταραχή στην οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης υπέρ των οξειδωτικών, δηλαδή τη δημιουργία οξειδωτικό στρες (Chan et al., 1999).



Εικόνα 1. Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Η γλυκόζη μετατρέπεται σε πεντόζες, με την πρώτη αντίδραση να καταλύεται από την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD).

Το οξειδωτικό στρες, δηλαδή η ανισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών μηχανισμών και οξειδωτικών υπέρ των δεύτερων, μπορεί να οδηγήσει τον οργανισμό που το υφίσταται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Ho et al., 2007). Όσον αφορά τα ερυθροκύτταρα, το οξειδωτικό στρες τα καθιστά επιρρεπή σε αιμόλυση. Από μπορεί να επέλθει κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, όπως μετά την κατανάλωση κουκιών και κάποιων φαρμάκων, καθώς και από σοβαρές λοιμώξεις (Kwok et al., 2002; Lim et al., 2005). Έτσι, όταν υπάρχει έλλειψη του G6PD [εννοείται μερική έλλειψη, καθώς ολική έλλειψη είναι ασύμβατη με τη ζωή (Beutler, 1994)], τα ερυθροκύτταρα γίνονται πιο επιρρεπή στην αιμόλυση κάτω από συνθήκες στρες όπως αυτές που προαναφέρθηκαν.



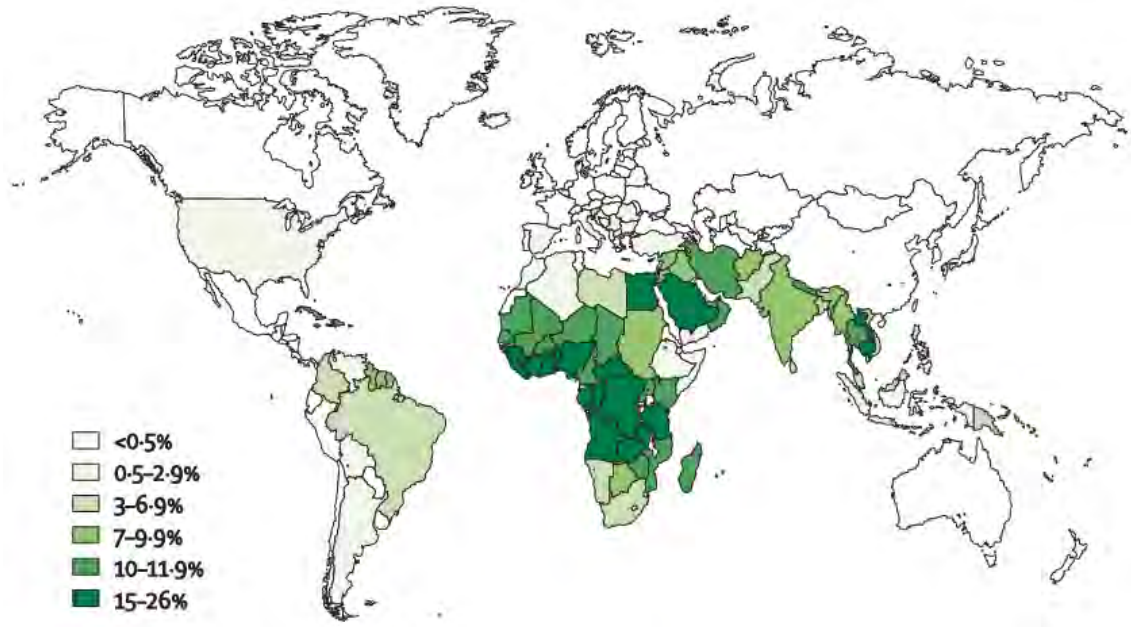
Εικόνα 2. Πρόκληση οξειδωτικού στρες λόγω ανισορροπίας μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και των αντιοξειδωτικών του οργανισμού.

2.1.1. Έλλειψη του G6PD

Καθώς το G6PD συμμετέχει στο μεταβολισμό, απαντάται σε όλα τα είδη κυττάρων. Ωστόσο, όσον αφορά την έλλειψη του G6PD, ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί κυρίως στα ερυθροκύτταρα, όπου γίνεται περισσότερη έκδηλη λόγω της ευπάθειας αυτών των κυττάρων και την συνακόλουθη εμφάνιση συμπτωμάτων (αιμολυτική αναιμία). Παρόλα αυτά, είναι γεγονός ότι όταν η έλλειψη του G6PD στα ερυθροκύτταρα είναι σοβαρή, τότε υπάρχει και σε κάποιο βαθμό έλλειψη και σε άλλα σωματικά κύτταρα (Luzzatto & Battistuzzi, 1985), όπως είναι τα μυϊκά. Σε μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζεται στους άρρενες, διότι η έλλειψη του G6PD είναι φυλοσύνδετη γενετική διαταραχή (Laosombat et al., 2006; Usanga & Ameen, 2000).

Όσον αφορά την επιδημιολογία της έλλειψης του G6PD, φαίνεται ότι αποτελεί μια από τις πιο συχνές ενζυμοπάθειες, καθώς υπολογίζεται ότι απαντάται σε πάνω από 400 εκατομμύρια ατόμων παγκοσμίως (Mehta et al., 2000; Turan, 2006). Παλιότερα στοιχεία (Missiou-Tsagaraki, 1991) έδειξαν ότι το 3.2% του γενικού πληθυσμού στην

Ελλάδα, και μέχρι και το 10% των κατοίκων της Θεσσαλίας, παρουσιάζει σε κάποιο βαθμό έλλειψη του G6PD.



Εικόνα 3. Η κατανομή της έλλειψης του G6PD παγκοσμίως (Cappellini & Fiorelli, 2008).

Τα ποσοστά ατόμων με έλλειψη του G6PD διαφέρουν αρκετά μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Μετά από παρατηρήσεις, φάνηκε ότι η διάδοση της έλλειψης σχετίζεται με τη γεωγραφική κατανομή της ελονοσίας. Δηλαδή άτομα με έλλειψη του G6PD μπορεί να έχουν μερική ανοσία στη μόλυνση από ελονοσία λόγω της φυσικής επιλογής απέναντι στην ελονοσία (WHO Working Group, 1989). Έτσι, αυξημένη συχνότητα εμφάνισης υπάρχει στην Ασία, στην Αφρική και στη Μεσόγειο (Frank, 2005).

2.1.1.1. Έλλειψη του G6PD και υγεία

Η έλλειψη του G6PD μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως οξεία αιμόλυση και χρόνια αιμόλυση, καθώς και νεογνική υπερχολερυθριναιμία

(ίκτερο). Εφόσον, όμως, ένα άτομο με έλλειψη δεν εκτεθεί σε οξειδωτικούς παράγοντες (π.χ. μολύνσεις, οξειδωτικά φάρμακα, κουκιά), μπορεί να μην εμφανίσει ποτέ συμπτώματα (Frank, 2005). Επιπλέον, η εκδήλωση των συμπτωμάτων εξαρτάται και από το βαθμό έλλειψης του G6PD, καθώς διαφορετικές γενετικές μεταλλάξεις προκαλούν και διαφορετικά επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας (Frank, 2005).

Παρόλο που δεν είναι καλά τεκμηριωμένο, φαίνεται ότι η έλλειψη του G6PD μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεια διάφορων ασθενειών (Ho et al., 2007). Όπως προαναφέρθηκε, η έλλειψη του G6PD προκαλεί διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων. Αποτέλεσμα αυτού μπορεί να είναι η δυσλειτουργία της κυτταρικής ανάπτυξης και σηματοδότησης, η ανώμαλη εμβρυϊκή ανάπτυξη, η αυξημένη ευαισθησία σε ιογενείς λοιμώξεις και η εμφάνιση εκφυλιστικών ασθενειών (Ho et al., 2007). Άλλες παθολογικές καταστάσεις στις οποίες φαίνεται ότι εμπλέκεται η μειωμένη δραστηριότητα του G6PD περιλαμβάνουν την υπέρταση (Matsui et al., 2006; Matsui et al., 2005) και το διαβήτη (Niazi, 1991). Από τη άλλη, έχει γίνει η υπόθεση ότι τα άτομα με έλλειψη του G6PD μπορεί να βρίσκονται σε μικρότερο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου, λόγω της μειωμένης ικανότητας πολλαπλασιασμού και της πρόωρης γήρανσης των κυττάρων που υφίστανται (Ho et al., 2007).

2.2. Οξειδοαναγωγικό σύστημα και άσκηση

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) κυρίως αποτελούν βλαβερά παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και περιλαμβάνουν διάφορα χημικά είδη, όπως είναι τα σουπεροξειδικά ανιόντα, οι υδροξυλικές ρίζες και τα υπεροξείδια του υδρογόνου. Τα ROS δημιουργούνται σε μεγαλύτερο ρυθμό κάτω από διάφορες συνθήκες στρες και αντιμετωπίζονται από τα κύτταρα με την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα που έχουν αναπτύξει (Finkel, 2000).

Ωστόσο, ένα κύτταρο μπορεί να αναπτύξει οξειδωτικό στρες όταν η αντιοξειδωτική άμυνα δεν μπορεί να συμβαδίσει με το ρυθμό που παράγονται τα ROS (Finkel, 2000; Martindale & Holbrook, 2002). Με άλλα λόγια, αναπτύσσεται μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών (ROS) και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων. Αυτή η ανισορροπία μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες διάφορων βιομορίων, όπως είναι το DNA και οι

πρωτεΐνες, γεγονός που μπορεί να επιφέρει αρνητικές συνέπειες για την υγεία του κυττάρου και εν τέλει του οργανισμού ολόκληρου (Sies, 1995).

Καθώς η έλλειψη του G6PD οδηγεί σε οξειδωτικό στρες ειδικά στα ερυθροκύτταρα, έχει φανεί ότι σε αυτά υπάρχει αυξημένη οξειδωτική βλάβη, με αποτέλεσμα την γρηγορότερη καταστροφή τους. Καθώς η οξειδοαναγωγική ανισορροπία που υφίστανται τα ερυθροκύτταρα με έλλειψη του G6PD είναι μια χρόνια κατάσταση, άτομα με αυτή την έλλειψη έχουν αυξημένη πιθανότητα για αυξημένη καταστροφή των ερυθροκυττάρων κάτω από συνθήκες στρες σε σχέση με υγιή άτομα, γεγονός που συχνά οδηγεί σε εκδήλωση ήπιας μέχρι σοβαρής αιμόλυσης (Chan et al., 1999).

Επιπλέον, η έλλειψη του G6PD μπορεί να επηρεάζει και άλλα κύτταρα του οργανισμού, καθιστώντας τα και αυτά ευάλωτα σε οξειδωτικό στρες. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την επίδραση που μπορεί να έχει η έλλειψη στην υγεία των ατόμων που την έχουν. Πράγματι, το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στη διαδικασία της γήρανσης και σε διάφορες σχετιζόμενες εκφυλιστικές ασθένειες (Gutteridge & Halliwell, 1994), όπως είναι οι νόσοι Πάρκινσον (Lotharius & Brundin, 2002) και Αλτσχάιμερ (Behl & Moosmann, 2002). Επομένως, έχει γίνει η υπόθεση ότι άτομα με έλλειψη του G6PD μπορεί να είναι πιο επιρρεπή στην εμφάνιση αυτών των παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

2.2.1. Έλλειψη του G6PD και άσκηση

Αυξημένη παραγωγή ROS μπορεί να γίνει κάτω από διάφορες συνθήκες στρες, συμπεριλαμβανομένης και της άσκησης. Ωστόσο, προκειμένου να μην γίνει ανεξέλεγκτη αυτή η παραγωγή των ROS (γεγονός που όπως προαναφέρθηκε θα είχε βλαπτικές επιδράσεις στα διάφορα βιομόρια), υπάρχουν διάφοροι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί που τα εξουδετερώνουν (Chan et al., 1999). Όσο πιο έντονη είναι η άσκηση, τόσο μεγαλύτερη είναι και η παραγωγή ROS. Ωστόσο, όταν κάποιος ασκείται συστηματικά, δημιουργούνται προσαρμογές στους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, προκειμένου τα κύτταρα να ανταποκρίνονται καλύτερα κάθε φορά στην αυξημένη παραγωγή ROS κατά την άσκηση. Ωστόσο, όταν υπάρχει έλλειψη του G6PD, τα κύτταρα έχουν μειωμένο ενδογενές αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα. Επομένως, τα ερυθροκύτταρα και τα μυϊκά κύτταρα που έχουν μειωμένη

δραστικότητα του G6PD, κάτω από συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες (όπως είναι η άσκηση) μπορεί να οδηγήσουν το άτομο με την έλλειψη να εμφανίσει αιμολυτική αναιμία ή/και μυϊκά συμπτώματα, αντίστοιχα.

Με βάση τα παραπάνω, έχει δημιουργηθεί η ανησυχία για την ασφαλή συμμετοχή των ατόμων με έλλειψη του G6PD σε άσκηση, ιδίως σε αυτή υψηλής έντασης και παρατεταμένης διάρκειας. Αυτό βασίζεται σε προηγούμενες αναφορές για εμφάνιση κάποιων συμπτωμάτων μετά από έντονη άσκηση, όπως αιμόλυση και μυαλγία (Bresolin et al., 1987; Bresolin et al., 1989; Ninfali et al., 1991; Bresolin et al., 1992). Από την άλλη, οι ελάχιστες πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την επίδραση της άσκησης σε άτομα με έλλειψη του G6PD, έχουν δείξει ότι δεν προκαλεί αιμόλυση, ούτε αυξάνει το οξειδωτικό στρες σε σχέση με άτομα που δεν έχουν την έλλειψη (Nikolaidis et al., 2006; Jamurtas et al., 2006; Theodorou et al., 2010).

2.3. Διατροφικές αντιοξειδωτικές ουσίες

Εκτός από την αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων που προέρχεται από ενδογενείς μηχανισμούς, υπάρχουν και αντιοξειδωτικές ουσίες που προέρχονται από τη διατροφή και συμμετέχουν στην άμυνα. Έτσι, αντιοξειδωτικές αλλά και οξειδωτικές ουσίες μπορούν να προέλθουν τόσο από την ενδογενή παραγωγή όσο και από τη διατροφή. Χαρακτηριστικά ως αντιοξειδωτικό περιγράφεται κάθε ουσία (ενζυμική και μη ενζυμική) που βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση ενός οξειδώσιμου υποστρώματος (Halliwell και Gutteridge, 1989).

Όσον αφορά τα ένζυμα που έχουν αντιοξειδωτική δράση, χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, τις υπεροξειδικές δισμουτάσες, την καταλάση και τις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Sies, 1995). Οι συγκεντρώσεις αυτών των ενζύμων μπορεί να ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών τμήματα ενός κυττάρου, αλλά και μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων (Sies, 1995).

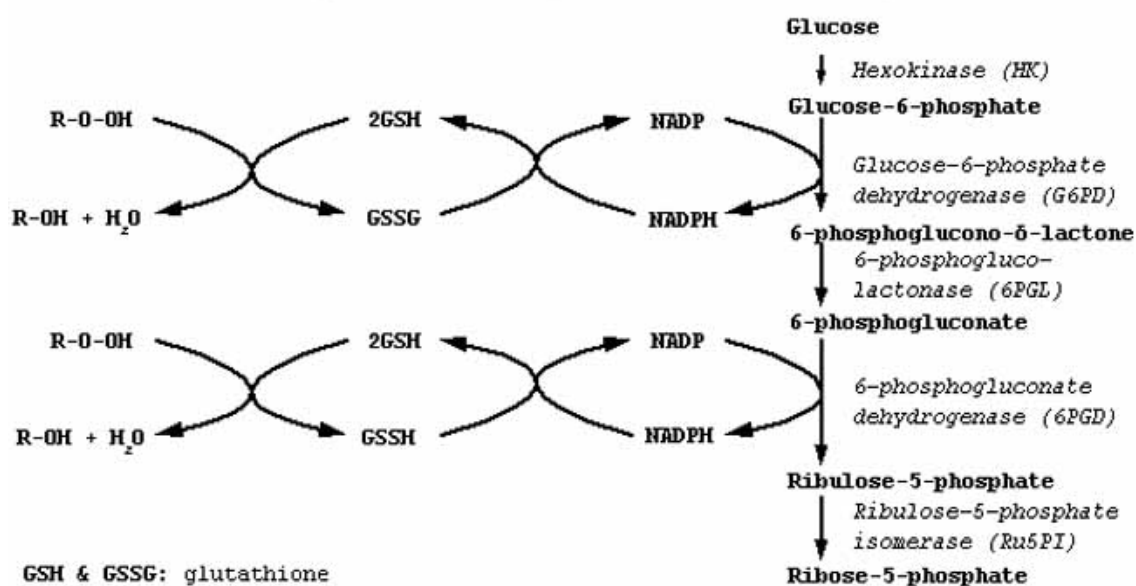
Όσον αφορά τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτά είναι ουσίες που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν ROS και μπορεί να προέρχονται είτε από ενδογενή παραγωγή (π.χ. GSH, ουμπικινόλες, ουρικό οξύ) είτε από εξωγενή χορήγηση, δηλαδή μέσω της διατροφής (π.χ. βιταμίνη C, βιταμίνη E, καροτενοειδή, λιποϊκό οξύ) (Chan et

al., 1999). Ειδικά όσον αφορά τα εξωγενώς προερχόμενα αντιοξειδωτικά, έχει φανεί ότι ο συνδυασμός βιταμινών E και C μπορεί να βελτιώσει την αντιοξειδωτική ικανότητα σε άτομα με έλλειψη του G6PD, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να μειώσει τα συμπτώματα αιμολυτικής κρίσης (El-Zoghby et al., 2007).

Όλο και μεγαλύτερο είναι το ενδιαφέρον των καταναλωτών αλλά και των ερευνητών για τα διατροφικά συμπληρώματα που περιέχουν ουσίες με αντιοξειδωτική δράση (Gigante et al., 2007; Simpure et al., 2006). Πράγματι, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη κάποιων βιταμινών, μετάλλων και άλλων διατροφικών συστατικών μπορεί να συμβάλλουν στην πρόληψη ή βελτίωση της έκβασης πολλών ασθενειών, όπως είναι οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο καρκίνος και η γήρανση (Wu et al., 2005; Hsia, 2007; Luchsinger et al., 2007; Marcason, 2007).

Από τις διατροφικές ουσίες, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν εκείνες που συμβάλλουν στη σύνθεση ή την αναγέννηση GSH, καθώς όπως προαναφέρθηκε η GSH είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων (Chan et al., 1999). Εξάντληση της GSH έχει σχετισθεί με κυτταρικό θάνατο, ενώ εμπλέκεται και σε πολλές εκφυλιστικές καταστάσεις (Kidd, 1997). Καθώς η συγκέντρωση της GSH είναι συνήθως μειωμένη σε άτομα με έλλειψη του G6PD, γίνεται εμφανές ότι είναι σημαντικό να βρεθούν τρόποι αποκατάστασης των επιπέδων της GSH προκειμένου να διατηρηθεί η υγεία των κυττάρων και κατ' επέκταση του οργανισμού αυτών των ατόμων.

The Pentose Phosphate Pathway and Glutathione production



Εικόνα 4. Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και η παραγωγή γλουταθειόνης (Προσαρμογή από Mehta et al., 2000).

Η GSH είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα κυστεΐνη, γλουταμινικό οξύ και γλυκίνη. Διατροφικές ουσίες που έχει φανεί ότι μπορούν σε κάποιες περιπτώσεις να οδηγήσουν σε αύξηση της συγκέντρωσης της GSH είναι η γλουταθειόνη που βρίσκεται σε διάφορες φυτικές και ζωικές τροφές (Kidd, 1997), το λιποϊκό οξύ που βρίσκεται κυρίως σε ζωικές τροφές και λιγότερο σε φυτικές (Packer et al., 2001), η N-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC) που κυρίως λαμβάνεται ως φαρμακευτικό σκεύασμα και τα πρόδρομα αμινοξέα της GSH, L-κυστεΐνη και L-μεθειονίνη, που βρίσκονται κυρίως σε ζωικές τροφές και συμπλήρωμα διατροφής αλλά με προβλητισμούς για την ασφάλεια των τελευταίων (Kidd, 1997).

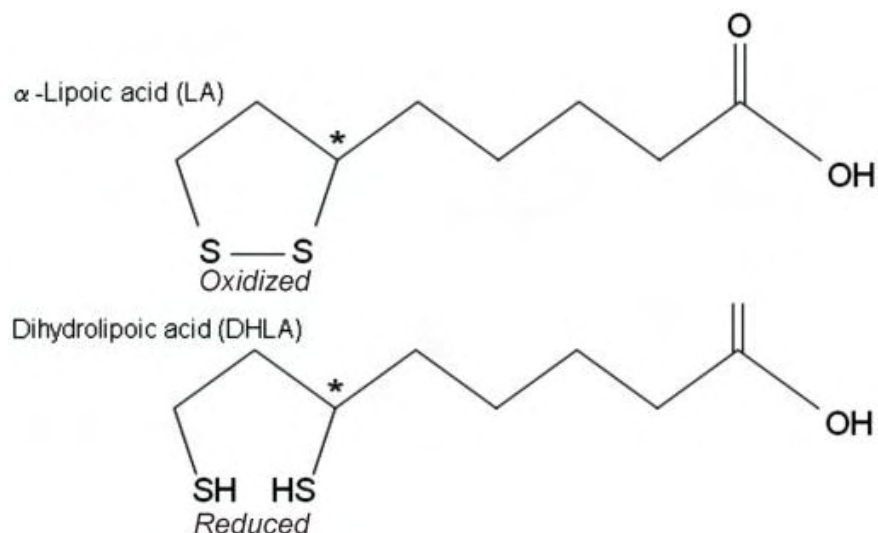
2.3.1. Λιποϊκό οξύ

Το λιποϊκό οξύ (και συγκεκριμένα το α-λιποϊκό οξύ) είναι μια φυσική διθειολική ένωση που παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της ενέργειας μέσα στο μιτοχόνδριο. Παράγεται ενδογενώς, μπορεί όμως να ληφθεί και από τη τροφή.

Μάλιστα, έχει γίνει η υπόθεση ότι το λιποϊκό οξύ που λαμβάνεται από το στόμα μπορεί να έχει επιπλέον βιοχημικές δράσεις με πιθανή φαρμακοθεραπευτική αξία ενάντια σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Το λιποϊκό οξύ είναι ένα συνηθισμένο συστατικό πολυβιταμινούχων σκευασμάτων και άλλων διατροφικών συμπληρωμάτων (Petersen Shay et al., 2009).

Διάφορα στοιχεία έχουν δείξει ότι το λιποϊκό οξύ δρα ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, ως αποτοξινωτικός παράγοντας, ως φάρμακο κατά του διαβήτη, βελτιώνει τα σχετιόμενα με τη γήρανση καρδιαγγειακά, γνωστικά και νευρομυϊκά ελλείμματα, και δρα ως διαμορφωτής διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών φλεγμονής (Smith et al., 2004; Scott et al., 1994; Devasagayam et al., 1993; Liu, 2002; Suh et al., 2004; Lodge et al., 1998; Anuradha & Varalakshmi, 1999; Han et al., 1997). Έτσι, λόγω των πολλών κυτταρικών και μοριακών λειτουργιών, η χρήση του λιποϊκού οξέος ως διατροφικό συμπλήρωμα και ως φαρμακοθεραπεία έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον (Petersen Shay et al., 2009).

Η οξειδωμένη (α-λιποϊκό οξύ) και η ανηγμένη (διδρο-λιποϊκό οξύ) μορφή του λιποϊκού οξέος δημιουργούν ένα ισχυρό οξειδοαναγωγικό ζεύγος που το καθιστά ένα από τα πιο ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά. Πράγματι, φαίνεται ότι και οι δυο μορφές έχουν την ικανότητα να αποτρέπουν το σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων και να εξουδετερώνουν διάφορα ROS. Ειδικότερα, εξουδετερώνουν τις υδροξυλικές ρίζες και το υποχλωριώδες οξύ, όχι όμως και το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Ξεχωριστά, το λιποϊκό οξύ εξουδετερώνει το μονήρες οξυγόνο, ενώ το διδρο-λιποϊκό οξύ αναγεννά άλλες ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες (π.χ. βιταμίνη C και βιταμίνη E) και εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες χωρίς ωστόσο να γίνεται το ίδιο ελεύθερη ρίζα (Scott et al., 1994; Devasagayam et al., 1993; Biewenga et al., 1997; Suzuki et al., 1991; Kaiser et al., 1989; Devasagayam et al., 1991; Haenen & Bast, 1991; Yan et al., 1996; Bast & Haenen, 2003). Ωστόσο, οι μέχρι τώρα μελέτες σχετικά με τις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ζεύγους λιποϊκού οξέος με διδρο-λιποϊκό οξύ έχουν γίνει κυρίως in vitro (Petersen Shay et al., 2009).



Εικόνα 5. Η οξειδωμένη (α -λιποϊκό οξύ) και η ανηγμένη (δϋιδρο-λιποϊκό οξύ) μορφή του λιποϊκού οξέος.

Το λιποϊκό οξύ χορηγείται σε διάφορες καταστάσεις οξειδωτικού στρες όπως σε διαβήτη, καταρράκτη, νευροεκφυλισμό, βλάβη από ακτινοβολία και γήρανση (Hagen et al., 1999; Demir et al., 2005; Cui et al., 2006; Kojima et al., 2007; Jariwalla et al., 2008). Φαίνεται ότι ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα, καθιστώντας τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στις περιβαλλοντικές προκλήσεις, διαφυλάσσοντας έτσι τη λειτουργία του ανοσοποιητικού (Palaniyappan & Alphonse, 2011). Τέλος, και στην αθλητική διατροφή έχει αρχίσει να γίνεται γνωστό, καθώς υποστηρίζεται ότι μπορεί να έχει και λιπολυτική δράση.

3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Σκοπός

Τα επίπεδα των ενδογενών αντιοξειδωτικών δεν μπορούν να διατηρηθούν υψηλά σε κύτταρα με έλλειψη του G6PD, με αποτέλεσμα τη δημιουργία οξειδοαναγωγικής ανισορροπίας σε αυτά. Έτσι, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD μετά τη συμπληρωματική λήψη λιποϊκού οξέος, καθώς και οι αποκρίσεις κατά την άσκηση. Πιο συγκεκριμένα, σκοπός ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο η συμπληρωματική λήψη λιποϊκού οξέος μπορεί να μειώσει τα επίπεδα δεικτών οξείδωσης (λιπιδικής υπεροξείδωσης και πρωτεϊνικής οξείδωσης) και συνεπώς να βελτιώσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση σε αυτά τα άτομα, επιφέροντας θετικές συνέπειες τόσο σε δείκτες υγείας όσο και στην απόδοση κατά την άσκηση.

3.2. Υλικό και Μέθοδος

Συμμετέχοντες

Στη μελέτη έλαβαν μέρος εθελοντικά 8 άνδρες (ηλικία: $38,4 \pm 5,6$ ετών) με έλλειψη του ενζύμου G6PD (μεσογειακού τύπου). Πριν την έναρξη της μελέτης, οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για τις πειραματικές διαδικασίες, καθώς και τα προσκοδόμενα οφέλη και τους κινδύνους από τη συμμετοχή τους σε αυτές. Αφού κατανόησαν και αποδέχθηκαν τους όρους, υπέγραψαν ένα έντυπο συναίνεσης (Παράρτημα II) και συμπλήρωσαν ένα ερωτηματολόγιο υγείας (Παράρτημα III) προκειμένου να γίνει βέβαιο ότι δεν πληρούν κάποιο από τα κριτήρια αποκλεισμού. Έπειτα τους δόθηκαν οδηγίες που περιλαμβάναν την αποχή από υψηλής έντασης φυσική δραστηριότητα τις 2 ημέρες πριν από κάθε επίσκεψη στο εργαστήριο για μετρήσεις. Ωστόσο, ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να μην αλλάξουν συνήθειες του τρόπου ζωής τους που σχετίζονται με τη φυσική δραστηριότητα και τη διατροφή.

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη: λήψη φαρμακευτικής αγωγή ή/και συμπληρωμάτων διατροφής που επηρεάζουν τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού κατά το τελευταίο εξάμηνο, σοβαρά προβλήματα υγείας κατά το παρελθόν που δεν θα επέτρεπαν τη συμμετοχή σε κάποιες από τις μετρήσεις (π.χ. καρδιοπάθειες), καθώς και προβλήματα με το ήπαρ και το γαστρεντερικό σύστημα.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Ο σχεδιασμός της μελέτης ήταν διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο δοκιμασία. Έτσι, οι συμμετέχοντες έλαβαν με τυχαία σειρά είτε διατροφικό συμπλήρωμα λιποϊκού οξέος (600 mg/ημέρα; Myprotein, Cheshire, UK) για τέσσερις εβδομάδες είτε εικονικό σκεύασμα για άλλες τέσσερις εβδομάδες. Μεταξύ των δυο, υπήρξε μια περίοδο έκπλυσης τέσσερις εβδομάδων.

Πριν την πρώτη επίσκεψη για μετρήσεις δόθηκαν οδηγίες στους συμμετέχοντες για την καταγραφή της διατροφής τους για δυο ημέρες, ώστε την ίδια διατροφή να την ακολουθήσουν ξανά για δυο ημέρες πριν από κάθε επόμενη επίσκεψη. Όλες οι μετρήσεις έγιναν με τους συμμετέχοντες να είναι νηστικοί από το προηγούμενο βράδυ, ενώ απείχαν και από την κατανάλωση αλκοόλ και καφεΐνης το προηγούμενο 24ωρο.

Κατά την πρώτη επίσκεψη έγινε αξιολόγηση της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO₂max). Οι υπόλοιπες μετρήσεις έγιναν πριν και αμέσως μετά το τέλος της λήψης του συμπληρώματος λιποϊκού οξέος και του εικονικού σκευάσματος (άλλες τέσσερις επισκέψεις στο εργαστήριο, συνολικά δηλαδή πέντε επισκέψεις). Οι μετρήσεις έγιναν πρωινές ώρες και πάντα σε χώρο με ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (20-22°C, 45-50% υγρασία).

Σε κάθε μια από τις τέσσερις επισκέψεις στο εργαστήριο (πριν και αμέσως μετά τη λήψη συμπληρώματος λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος) πραγματοποιήθηκαν οι εξής μετρήσεις:

- Σωματομετρικά χαρακτηριστικά/σωματική σύσταση (βάρος, δείκτης μάζας σώματος, συνολικό λίπος, περίμετρος μέσης, περίμετρος ισχίου, λόγος περιμέτρων μέσης/ισχίου)
- Δοκιμασία αξιολόγησης της απόδοσης κατά την άσκηση (μέχρι εξάντλησης σε δαπεδοεργόμετρο)

- Λήψη δείγματος αίματος πριν, αμέσως μετά και μια ώρα μετά τη δοκιμασία άσκησης για προσδιορισμό δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης.

Σωματομετρικά χαρακτηριστικά/Σωματική σύσταση

Το ύψος μετρήθηκε με προσέγγιση 1 mm και βάρος με προσέγγιση 100 g χρησιμοποιώντας μηχανικό ζυγό με αναστημόμετρο (Beam Balance, Seca, UK). Κατά τις μετρήσεις, οι συμμετέχοντες ήταν ελαφρά ντυμένοι και ξυπόλυτοι. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) με την εξίσωση: $\Delta\text{ΜΣ} = \text{βάρος}/\text{ύψος}^2$.

Η σωματική σύσταση (ποσοστό συνολικού λίπους και άλιπης μάζας σώματος) προσδιορίστηκε εξετάζοντας τους συμμετέχοντες σε μηχανήμα (Lunar DPX NT, GE Healthcare, UK) με τη μέθοδο της απορροφησιομετρίας ακτίνων X διπλής ενέργειας (dual-energy X-ray absorptiometry – DEXA).

Δοκιμασία προσδιορισμού $\text{VO}_{2\text{max}}$

Η δοκιμασία για τον προσδιορισμό της $\text{VO}_{2\text{max}}$ πραγματοποιήθηκε σε δαπεδοεργόμετρο. Εν συντομία, αρχικά πραγματοποιήθηκε εξοικείωση με το δαπεδοεργόμετρο, ώστε να μπορούν οι συμμετέχοντες να κινούνται και να κατεβαίνουν άνετα από το αυτό με ασφάλεια. Στη συνέχεια έγινε ολιγόλεπτη προθέρμανση και μετά τους τοποθετήθηκε καρδιοσυχνόμετρο (Polar RC3 GPS HR; Polar Electro Oy, Kempele, Finland) και η μάσκα του αναλυτή αερίων για καταγραφή των δεδομένων κατά τη δοκιμασία. Με την έναρξη της δοκιμασίας άσκησης, για δυο λεπτά ο κάθε συμμετέχοντας έκανε άσκηση σε σταθερή ταχύτητα που ανταποκρινόταν περίπου στο 60% της εκτιμώμενης $\text{VO}_{2\text{max}}$ του, ενώ στη συνέχεια η ταχύτητα αυξανόταν κατά 0,5 χιλιόμετρα/ώρα (km/h) κάθε λεπτό.

Δοκιμασία αξιολόγησης της απόδοσης κατά την άσκηση

Έγινε δοκιμασία σε δαπαδοεργόμετρο για την αξιολόγηση του χρόνου μέχρι την εξάντληση ως δείκτη αερόβιας αντοχής κάθε φορά που οι συμμετέχοντες ξεκινούσαν ή ολοκλήρωναν τη λήψη μιας ουσίας (λιποϊκό οξύ ή εικονικό φάρμακο). Κατά τη δοκιμασία ο κάθε συμμετέχοντας ασκήθηκε με ταχύτητα που ανταποκρινόταν περίπου σε ένταση στο 70-75% της VO_{2max} του για 45 λεπτά. Με το πέρας των 45 λεπτών, η ταχύτητα αυξήθηκε ώστε να αντιστοιχεί στο 90% της VO_{2max} μέχρι να επέλθει εξάντληση, ενώ ο χρόνος αυτός καταγράφηκε για αξιολόγηση της απόδοσης. Σε όλη τη δοκιμασία, η καρδιακή συχνότητα ελεγχόταν με καρδιοσυχνόμετρο (Polar RC3 GPS HR; Polar Electro Oy, Kempele, Finland), η ανταλλαγή αερίων με σταθερό αναλυτή αερίων και η αντιλαμβανόμενη αίσθηση κόπωσης με την κλίμακα Borg, κάθε πέντε λεπτά.

Συλλογή και χειρισμός των δειγμάτων αίματος

Οι συμμετέχοντες βρίσκονταν σε ηρεμία για 10 λεπτά πριν από κάθε αιμοληψία, η οποία στη συνέχεια έγινε ενώ βρίσκονταν σε ύπτια θέση. Όλα τα δείγματα φλεβικού αίματος λήφθηκαν από τη βασιλική ή μεσοβασιλική ή κεφαλική φλέβα των άνω άκρων με τη χρήση βελόνας. Τα υλικά αιμοληψίας ήταν μιας χρήσης και τηρήθηκαν όλοι οι προβλεπόμενοι κανόνες ασηψίας και αντισηψίας.

Πριν λάβουν μέρος στη μελέτη οι συμμετέχοντες, έγινε μια αιμοληψία (2 ml) για προσδιορισμό της δραστηριότητας του G6PD στα ερυθροκύτταρα, ώστε να τεκμηριωθεί η ύπαρξη της έλλειψης του G6PD και ο βαθμός αυτής. Το αίμα συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο που περιείχαν ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) και ανακινήθηκαν αμέσως. Ο προσδιορισμός έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του αντιδραστηρίου μέσα σε μια ώρα από τη στιγμή της αιμοληψίας. Επιπλέον έγινε γενική ανάλυση αίματος, καθώς ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του G6PD στα ερυθροκύτταρα εξαρτάται από την αιμοσφαιρίνη (Hb). Η δραστηριότητα του G6PD ήταν 0.502 ± 0.01 U/g Hb.

Γενική ανάλυση αίματος. Μια ποσότητα αίματος (1-2 ml) συλλέχθηκε σε φιαλίδιο με EDTA και αμέσως έγινε ανάδευση. Ο προσδιορισμός των αιματολογικών παραμέτρων έγινε σε αυτόματο αναλυτή Mythic 18 (Orphée).

Ορός. Κάποια ποσότητα αίματος (5-7 ml) τοποθετήθηκε σε σωληνάρια διαχωρισμού ορού που περιείχαν ενεργοποιητή της πήξης. Αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά ώστε να πήξει το αίμα και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντριση στα 1370 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα συλλέχθηκε το υπερκείμενο υποκίτρινο υγρό (ορός), το οποίο τοποθετήθηκε σε φιαλίδια τύπου Eppendorf™. Αμέσως έγινε αποθήκευση των φιαλιδίων στους -80°C και κάθε ένα από αυτά αποψύχτηκε μόνο μια φορά για ανάλυση. Ο ορός χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Αναλύσεις δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης

Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Αρχικά σε σωλήνες falcon γίνεται προσθήκη: α) 100 μ L ορού (ή αποσταγμένου νερού για το τυφλό), β) 500 μ L διαλύματος TCA 35% (w/v), και γ) 500 μ L διαλύματος Tris-HCl 200 mmol/L (pH 7,4). Έπειτα γίνεται καλή ανάδευση και παραμονή των δειγμάτων για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL διαλύματος Na₂SO₄ 2 mol/L και θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) 55 mmol/L και θερμαίνονται τα δείγματα στους 95°C για 45 min σε υδατόλουτρο. Μετά την επώαση, μεταφέρονται τα δείγματα σε πάγο για 5 min, προστίθεται 1 mL διαλύματος TCA 70% (w/v) και γίνεται καλή ανάδευση. Έστερα μεταφέρεται 1 mL από κάθε μίγμα σε φιαλίδια eppendorf, γίνεται φυγοκέντριση στα 11200 g για 3 min στους 25°C και, αφού ληφθεί το υπερκείμενο, γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης του κάθε μίγματος στα 530 nm αφού τοποθετηθούν σε πλαστικές κυψελίδες. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης C των TBARS σε μ mol/L γίνεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$C = (A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}) / 156 \times 31 \times 1000$$

όπου:

- $A_{\text{δείγματος}}$ και $A_{\text{τυφλού}}$ η απορρόφηση του δείγματος και του τυφλού αντίστοιχα,

- 156 ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας του TBA σε L/mmol/cm,
- 31 ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του μίγματος (3100 μ L) με τον όγκο του ορού (100 μ L), και
- 1000 ο συντελεστής μετατροπής των mmol/L σε μ mol/L.

Τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και δίνουν έγχρωμο προϊόν, του οποίου η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους.

Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Patsoukis και των συνεργατών του (2004). Κάθε δείγμα είχε το δικό του τυφλό και προσδιορίστηκε εις διπλούν. Αρχικά γίνεται ανάμειξη 50 μ L πλάσματος με 50 μ L TCA 20% σε τέσσερα φιαλίδια τύπου Eppendorf™ (δυο για το τυφλό – δυο για το δείγμα). Τα μίγματα επωάζονται σε πάγο για 15 min και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Έπειτα γίνεται προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου προκειμένου να μείνει μόνο το ίζημα κι έπειτα σε αυτό προστίθεται DNPH (διαλυμένο σε 2,5 N HCL) συγκέντρωσης 10 mM για τα δείγματα ή HCL συγκέντρωσης 2,5 N για τα τυφλά. Όλα επωάζονται στο σκοτάδι για 1 ώρα με ανακίνηση κάθε 15 min. Έπειτα γίνεται φυγοκέντρωση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο και πάλι απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται 1 mL TCA 10%. Τα δείγματα ανακινούνται και φυγοκεντρώνονται στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται άλλη μια φορά και στο ίζημα προστίθεται 1 mL μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v). Τα δείγματα ανακινούνται και φυγοκεντρώνονται στα 15000 g για 5 min στους 4°C με το τελευταίο βήμα να επαναλαμβάνεται για ακόμα δυο φορές. Μετά το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται 1 mL ουρίας συγκέντρωσης 5M (pH 2,3). Τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται για 15 min στους 37°C. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στα 15000 g για 5 min στους 4°C και η απορρόφηση μετρείται στα 375 nm (Patsoukis, et al., 2004).

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζεται με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DNPΗ, ακολουθώντας την εξίσωση: $C \text{ (nmol/mg ολικής πρωτεΐνης)} = (A_{\text{Δείγματος}} - A_{\text{Τυφλού}}) / 0,022 \times 20$, όπου:

- 0,022 ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ εκφρασμένος σε $\text{nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- 20 ο συντελεστής αραίωσης
- οι συντελεστές μεταβλητότητας (intra-assay και inter assay coefficient of variation) για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι 3,8% και 6,4%, αντίστοιχα

Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται είναι ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο $p=0.05$. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης δυο παραγόντων με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο χρόνο (repeated measures analysis of variance) για να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές μεταξύ λιποϊκού οξέος και εικονικό σκεύασμα, πριν και αμέσως μετά από τη λήψη του καθενός. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS Έκδοση 18.0 (SPSS Inc., USA).

3.3. Αποτελέσματα

Τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά και η σύσταση σώματος των συμμετεχόντων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Δεν υπήρξε αλλαγή σε αυτές τις παραμέτρους.

Δεν φάνηκε να μεταβάλλεται το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας και η αρτηριακή πίεση μετά από λήψη συμπληρώματος λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος. Η καρδιακή συχνότητα ηρεμίας ωστόσο μειώθηκε σημαντικά μετά τη λήψη λιποϊκού οξέος. Όσον αφορά την απόδοση κατά την άσκηση, δεν παρουσιάστηκε διαφορά στο χρόνο μέχρι την εξάντληση μετά από λήψη συμπληρώματος λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος (Πίνακας 2).

Όσον αφορά τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης των TBARS (Σχήμα 1) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Σχήμα 2) σε κανένα χρονικό σημείο για καμία από τις δυο καταστάσεις.

Πίνακας 1. Σωματομετρικά χαρακτηριστικά και σωματική σύσταση πριν και μετά τη λήψη συμπληρώματος λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.

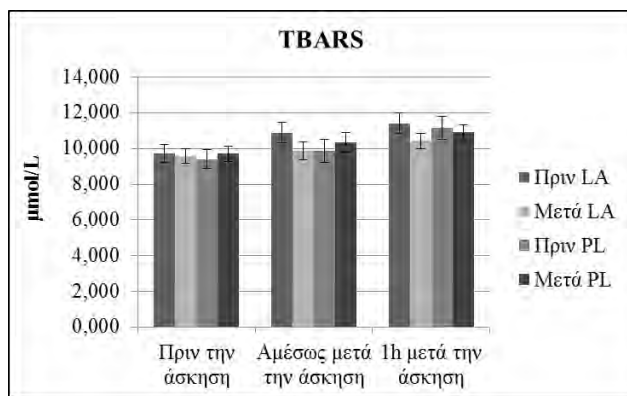
	Λιποϊκό οξύ		Εικονικό σκεύασμα	
	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά
Βάρος (kg)	81.64±5.65	81.67±5.32	81.53±5.96	82.00±5.86
ΔΜΣ (kg/m²)	25.99±1.50	26.02±1.40	25.94±1.58	26.09±1.53
% Συνολικό Λίπος	25.84±2.16	25.36±2.32	25.43±2.18	26.37±1.92
Περίμετρος μέσης (cm)	89.36±8.37	89.14±9.00	88.57±8.78	88.64±8.00
Περίμετρος ισχίου (cm)	104.7±6.7	104.1±6.7	104.6±6.4	104.3±6.4
WHR	0.853±0.017	0.855±0.018	0.846±0.016	0.849±0.014

ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος, WHR: Λόγος περιμέτρου μέσης προς περίμετρο ισχίου.

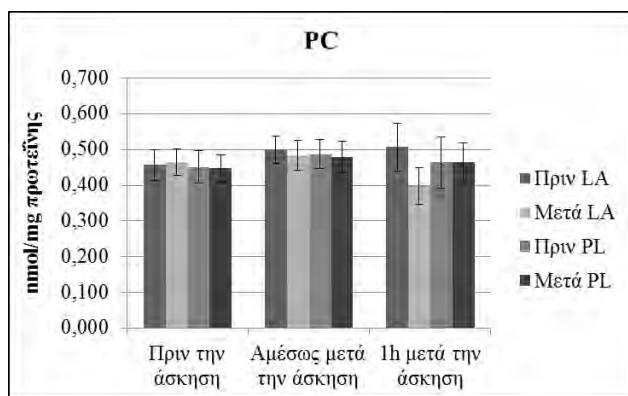
Πίνακας 2. Φυσιολογικές παράμετροι και απόδοση κατά την άσκηση πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.

	Λιποϊκό οξύ		Εικονικό σκεύασμα	
	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά
IPAQ (MET-min/week)	1226±336	1199±281	922±323	981±336
ΚΣΗ	63.43±2.5	59.29±1.91	62.14±2.5	62.00±2.7
	7	*	3	3
Συστολική πίεση (mm Hg)	130.9±11.	130.0±12.7	130.6±11.	129.1±12.
	7		1	0
Διαστολική πίεση (mm Hg)	82.0±7.4	80.0±5.9	81.7±6.5	78.6±4.4
Χρόνος μέχρι την εξάντληση (s)	198.9±37.	246.9±37.6	207.9±37.	267.4±36.
	0		4	4

*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με πριν τη λήψη λιποϊκού οξέος. *IPAQ*: International Physical Activity Questionnaire, *MET*: Metabolic Equivalent of Task, *ΚΣΗ*: Καρδιακή Συχνότητα Ηρεμίας.



Σχήμα 1. Συγκέντρωση ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) μετά τη λήψη λιποϊκού οξέος (LA) και μετά τη λήψη εικονικού σκευάσματος (PL) σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD.



Σχήμα 2. Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) μετά τη λήψη λιποϊκού οξέος (LA) και μετά τη λήψη εικονικού σκευάσματος (PL) σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD.

3.4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί κατά πόσο η συμπληρωματική λήψη λιποϊκού οξέος μπορεί να μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD τόσο στην ηρεμία όσο και ως απόκριση στην άσκηση, και κατά πόσο μια πιθανή μεταβολή θα μπορούσε να συμβάλλει και στην καλύτερη απόδοση κατά την άσκηση.

Αρχικά έγινε η υπόθεση ότι, καθώς τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD έχουν αυξημένη ευπάθεια στη δημιουργία οξειδωτικού στρες, η συμπληρωματική λήψη μιας αντιοξειδωτικής ουσίας όπως το λιποϊκό οξύ θα βοηθούσε στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων. Επιπλέον, έγινε η υπόθεση πως πιθανή βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης θα μπορούσε να συμβάλλει και στην καλύτερη απόδοση κατά την άσκηση λόγω μειωμένης παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η συμπληρωματική χορήγηση λιποϊκού οξέος για 4 εβδομάδες δεν μεταβάλλει σημαντικά δείκτες οξείδωσης σε τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD σε κανένα χρονικό σημείο. Πιο συγκεκριμένα, δεν υπήρξε καμία μεταβολή στα επίπεδα τόσο των TBARS (ως δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης) όσο και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (ως δείκτη οξείδωσης πρωτεϊνών). Όσον αφορά τα TBARS, προηγούμενες μελέτες δεν έχουν ξεκαθαρίσει εάν τα άτομα με έλλειψη του G6PD έχουν υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με άτομα με φυσιολογική δραστηριότητα αυτού του ενζύμου (Bilmen et al., 2001; Gurbuz et al., 2004; Nikolaidis et al., 2006). Σχετικά με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, σε μια μελέτη φάνηκε ότι τα επίπεδα δεν διαφέρουν μεταξύ ατόμων με έλλειψη και χωρίς έλλειψη του G6PD (Theodorou et al., 2010). Συμπερασματικά, η συμπληρωματική λήψη λιποϊκού οξέος δεν μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του G6PD πιθανώς λόγω των αντισταθμιστικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών που πρέπει να έχουν αναπτύξει τα κύτταρα με την έλλειψη, προκειμένου να ανταπεξέρχονται στο οξειδωτικό στρες, και οι οποίοι δεν επιτρέπουν να φανεί κάποιο επιπλέον όφελος από τη χορήγηση της συγκεκριμένης αντιοξειδωτικής ουσίας, τουλάχιστον σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Επιπρόσθετα, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στα επίπεδα των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά την άσκηση (τόσο αμέσως μετά όσο και 1 ώρα μετά την άσκηση). Προηγούμενη μελέτη ωστόσο έχει δείξει ότι η άσκηση οδήγησε στην

αύξηση αυτών των δεικτών σε άτομα με έλλειψη του G6PD (Nikolaidis et al., 2006). Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως το πρωτόκολλο άσκησης και η αρχική κατάσταση των συμμετεχόντων.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι οι δείκτες που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν στον ορό. Γενικά τα επίπεδα των δεικτών που μετρώνται στον ορό αντανακλούν τα επίπεδα αυτών σε όλο τον οργανισμό. Επομένως, γίνεται η υπόθεση ότι το συγκεκριμένο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε δεν ήταν ικανό να μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη δοσολογία, στο χρονικό διάστημα χορήγησης της ουσίας, αλλά και στην αρχική κατάσταση των συμμετεχόντων όσο αφορά τα επίπεδα οξειδωτικού στρες. Επιπρόσθετα, η δοκιμασία άσκησης που επιλέχθηκε μπορεί να μην ήταν ικανή να προκαλέσει έντονο στρες ώστε να γίνουν εμφανείς οι διαφορές μεταξύ της συμπληρωματικής λήψης λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευασμάτος κυρίως κατά την αποκατάσταση (1 ώρα μετά την άσκηση). Πρωτόκολλα άσκησης που προκαλούν μυϊκή βλάβη καθώς και μετρήσεις δεικτών σε περισσότερα χρονικά σημεία μπορεί να δώσουν μια καλύτερη εικόνα.

3.5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι η συμπληρωματική χορήγηση λιποϊκού οξέος για 4 εβδομάδες δεν μετέβαλλε στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του G6PD. Επιπλέον, δεν υπήρξε κάποια επίδραση την απόδοση κατά την άσκηση από τη λήψη του συμπληρώματος. Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αλλά και στην ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα που πιθανώς έχουν αναπτύξει αυτά τα άτομα ώστε να ανταπεξέρχονται στην αυξημένη ευπάθεια για οξειδωτικό στρες που παρουσιάζουν λόγω της έλλειψης του ενζύμου.

Σε μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να εφαρμοστούν διαφορετικά σχήματα χορήγησης λιποϊκού οξέος διαφορετικής χρονικής διάρκειας και δοσολογίας. Επιπλέον, θα μπορούσε να μελετηθεί η επίδραση διαφορετικών τύπων έλλειψης του ενζύμου, καθώς διαφορετικά επίπεδα δραστηριότητας οδηγούν και σε διαφορετικό βαθμό ευπάθειας σε οξειδωτική προσβολή. Επιπρόσθετα, περισσότεροι δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης τόσο στο αίμα όσο και στους ασκούμενους μύες θα μπορούσαν να δώσουν περισσότερες πληροφορίες για την επίδραση της συμπληρωματικής λήψης του λιποϊκού οξέος. Τέλος, η εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου άσκησης που προκαλεί μυϊκή βλάβη, όπου τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες αυξάνονται σε μεγάλο βαθμό, θα μπορούσε να δώσει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την απόκριση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD μετά τη χορήγηση λιποϊκού οξέος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Anuradha B, Varalakshmi P. Protective role of DL-alpha-lipoic acid against mercury-induced neural lipid peroxidation. *Pharmacol Res.* 1999, 39:67-80.
- Bast A, Haenen GR. Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors* 2003, 17:207-213.
- Behl C, Moosmann B. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol Chem.* 2002, 383:521-536.
- Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994, 84:3613-3636.
- Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol.* 1997, 29:315-331.
- Bilmen S, Aksu TA, Gumuslu S, Korgun DK, Canatan D. Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2001, 303:83-86.
- Bresolin N, Bet L, Moggio M, Meola G, Comi G, Scarlato G. Muscle G6PD deficiency. *Lancet* 1987, i:212-213.
- Bresolin N, Bet L, Moggio M, Meola G, Fortunato F, Comi G, Adobbati L, Geremia L, Pittalis S, Scarlato G. Muscle glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Neurol.* 1989, 236:193-198.
- Bresolin N, Comi PG, Ninfali P, Meola G, Gallanti A, Ravasio A, Piscaglia MG, Felisari G, Bardoni A, Scarlato G. Muscular G6PD deficiency: a definite clinical syndrome? *Clin Neuropathol.* 1992, 11:89.
- Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008, 371(9606):64-74.
- Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *P.S.E.B.M.* 1999, 222:274-282.
- Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long J, Packer L, Liu J. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *J Neurosci Res.* 2006, 83:1584-1590.
- Demir U, Demir T, Ilhan N. The protective effect of alpha-lipoic acid against oxidative damage in rabbit conjunctiva and cornea exposed to ultraviolet radiation. *Ophthalmologica* 2005, 219:49-53.

- Devasagayam TP, di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Singlet oxygen induced singlestrand breaks in plasmid pBR322 DNA: the enhancing effect of thiols. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1088:409-412.
- Devasagayam TP, Subramanian M, Pradhan DS, Sies H. Prevention of singlet oxygen-induced DNA damage by lipoate. *Chem Biol Interact.* 1993, 86:79-92.
- El-Zoghby SM, Helmy MH, Ghanem AM, Hanafi MY, El-Nabi Kamela MA, El-Sayed AA. The status of antioxidant defences in g-6-pd deficient patients. The role of antioxidants to ameliorate hemolytic crisis. *Egyptian J Biochem Mol Biol.* 2007, 25(2):114-133.
- Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 2000, 476:52-54.
- Frank JE. Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. *Am Fam Physician.* 2005, 72:1277-1282.
- Gaetani GF, Rolfo M, Arena S, Mangerini R, Meloni GF, Ferraris AM. Active Involvement of Catalase During Hemolytic Crises of Favism. *Blood* 1996, 88(3):1084-1088.
- Georgakouli K, Deli CK, Zalavras A, Fatouros IG, Kouretas D, Koutedakis Y, Jamurtas AZ. a-Lipoic acid supplementation up-regulates antioxidant capacity in adults with G6PD deficiency. *Food Chem Toxicol.* 2013, 61:69-73
- Gigante DP, Buchweitz M, Helbig E, Almeida AS, Araujo CL, Neumann NA, Victora C. Randomized clinical trial of the impact of a nutritional supplement "multimixture" on the nutritional status of children enrolled at preschools. *J Pediatr.* 2007, 83:363-369.
- Gurbuz N, Yalcin O, Aksu TA, Baskurt OK. The relationship between the enzyme activity, lipid peroxidation and red blood cells deformability in hemizygous and heterozygous glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals. *Clin Hemorrhheol Microcirc.* 2004, 31:235-242.
- Gutteridge JM, Halliwell B. (1994). Antioxidants in nutrition, health, and disease, Νέα Υόρκη, Oxford University Press, 1994:111-123.
- Haenen GR, Bast A. Scavenging of hypochlorous acid by lipoic acid. *Biochem Pharmacol.* 1991, 42:2244-2246.
- Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V, Bartholomew JC, Ames AB. R-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved

- mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J.* 1999, 13:411-418.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, 2^η Έκδοση, Ηνωμένο Βασίλειο, Oxford University Press, 1989.
- Han D, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Tritschler HJ, Packer L. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *Am J Physiol.* 1997, 273:R1771-R1778.
- Ho HY, Cheng ML, Chiu DT. Glucose-6-phosphate dehydrogenase – from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Report* 2007, 12(3):109-118.
- Hsia J, Heiss G, Ren H, Allison M, Dolan NC, Greenland P, Heckbert SR, Johnson KC, Manson JE, Sidney S, Trevisan M. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation* 2007, 115:846-854.
- Ninfali P, Bresolin N, Baronciani L, Fortunato F, Comi G, Magnani M, Scarlato G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Lodi 844 C: A study on its expression in blood cells and muscle. *Enzyme* 1991, 45:180-187.
- Jariwalla RJ, Lalezari J, Cenko D, Mansour SE, Kumar A, Gangapurkar B, Nakamura D. Restoration of blood total glutathione status and lymphocyte function following alpha-lipoic acid supplementation in patients with HIV infection. *J Altern Complement Med.* 2008, 14:139-146.
- Kaiser S, di Mascio P, Sies H. Lipoat und Singulett-sauerstoff, in: HO Borbe, H Ulrich (Eds.), Thioctseure, pmi Verlag GmbH, Frankfurt, 1989:69-76.
- Kidd PM. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt Med Rev.* 1997, 2(3):155-176.
- Kojima M, Sun L, Hata I, Sakamoto Y, Sasaki H, Sasaki K. Efficacy of alpha-lipoic acid against diabetic cataract in rat. *Jpn J Ophthalmol.* 2007, 51:10-13.
- Kwok CJ, Martin AC, Au SW, Lam VM. G6PDdb, an integrated database of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations. *Hum Mutat.* 2002, 19(3):217-224.
- Lands LC, Grey VL, Smountas AA. Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *J Appl Physiol* (1985) 1999, 87(4):1381-1385.

- Laosombat V, Sattayasevana B, Chotsampancharoen T, Wongchanchailert M. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Variants Associated with Favism in Thai Children. *Int J Hematol*. 2006, 83(2):139-143.
- Leopold JA, Cap A, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J*. 2001, 15(10):17771-17773.
- Lim F, Vulliamy T, Abdalla SH. An Ashkenazi Jewish woman presenting with favism. *J Clin Pathol*. 2005, 58(3):317-319.
- Liu J, Head E, Gharib AM, Yuan W, Ingersoll RT, Hagen TM, Cotman CW, Ames BN. Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or Ralphi-lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci*. 2002, 99:2356-2361.
- Lodge JK, Traber MG, Packer L. Thiol chelation of Cu²⁺ by dihydrolipoic acid prevents human low density lipoprotein peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 1998, 25:287-297.
- Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci*. 2002, 3:932-942.
- Luchsinger JA, Tang MX, Miller J, Green R, Mayeux R. Relation of higher folate intake to lower risk of Alzheimer disease in the elderly. *Arch Neurol*. 2007, 64:86-92.
- Luzzatto L, Battistuzzi G. Glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Adv Hum Genet*. 1985, 14:217-329.
- Marcason W. Is supplementation of B vitamins still recommended to reduce the risk of heart disease? *J Am Diet Assoc*. 2007, 107:525-531.
- Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002, 192:1-15.
- Matsui R, Xu S, Maitland KA, Hayes A, Leopold JA, Handy DE, Loscalzo J, Cohen RA. Glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency decreases the vascular response to angiotensin II. *Circulation* 2005, 112:257-263.
- Matsui R, Xu S, Maitland KA, Mastroianni R, Leopold JA, Handy DE, Loscalzo J, Cohen RA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases

- vascular superoxide and atherosclerotic lesions in apolipoprotein E(–/–) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006, 26:910-916.
- Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 2000, 13(1):21-38.
- Missiou-Tsagaraki S. Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency as a preventive measure: prevalence among 1,286,000 Greek newborn infants. *J Pediatr.* 1991, 119(2):293-299.
- Niazi GA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and diabetes mellitus. *Int J Hematol.* 1991, 54(4):295-298.
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 2006, 38(8):1443-1450.
- Ninfali P, Bresolin N, Baronciani L, Fortunato F, Comi G, Magnani M, Scarlato G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Lodi 844 C: A study on its expression in blood cells and muscle. *Enzyme* 1991, 45:180-187.
- Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 2001, 17:888-895.
- Palaniyappan A, Alphonse R. Immunomodulatory effect of DL- α -lipoic acid in aged rats. *Exp Gerontol.* 2011, 46(9):709-715.
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylentetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett.* 2004, 357(2):83-86.
- Petersen Shay K, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement. Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009, 1790(10):1149-1160.
- Schuurman M, Waardenburg D, Costa JD, Niemarkt H, Leroy P. Severe hemolysis and methemoglobinemia following fava beans ingestion in glucose-6-phosphatase dehydrogenase deficiency: case report and literature review. *Eur J Pediatrics* 2009, 168(7):779-782.

- Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, Tritschler H, Halliwell B. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res.* 1994, 20:119-133.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense: Relations to oxidative stress. In: *Signaling mechanisms - from transcription factors to oxidative stress*, ed. Packer L, Wirtz K. NATO ASI Series, Berlin Heidelberg Springer-Verlag 1995, 92:165-186.
- Simpore J, Kabore F, Zongo F, Dansou D, Bere A, Pignatelli S, Biondi DM, Ruberto G, Musumeci S. Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. *Nutr J.* 2006, 5:3-7.
- Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2004, 11:1135-1146.
- Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:3381-3386.
- Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Radic Res Commun.* 1991, 15:255-263.
- Theodorou AA, Nikolaidis MG, Paschalis V, Sakellariou GK, Fatouros IG, Koutedakis Y, Jamurtas AZ. Comparison between glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient and normal individuals after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2010, 42 (6):1113-1121.
- Turan Y. Prevalence of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the population of western Turkey. *Arch Med Res.* 2006, 37(7):880-882.
- Usanga EA, Ameen R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Kuwait, Syria, Egypt, Iran, Jordan and Lebanon. *Hum Hered.* 2000, 50(3):158-161.
- WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ.* 1989, 67:601-611.

- Wu LC, Ho JA, Shieh MC, Lu IW. Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. J Agric Food Chem. 2005, 53:4207-4212.
- Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L. (1996). Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. Arch Biochem Biophys. 1996, 327:330-334.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



Εσωτερική Επιτροπή Δεοντολογίας

Τρίκαλα: 10/02/2016

Αριθμ. Πρωτ.: 1076

Βεβαίωση έγκρισης της πρότασης για διεξαγωγή Έρευνας με τίτλο:

Διερεύνηση και σύγκριση των προκαλούμενων με την οξεία άσκηση αλλαγών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) μετά τη συμπληρωματική λήψη λιποϊκού οξέος και N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC)

Επιστημονικός υπεύθυνος – επιβλέπων: Τζιαμούρτας Αθανάσιος

Κύρια ερευνήτρια – φοιτήτρια: Γεωργακούλη Καλλιόπη

Ίδρυμα & Τμήμα: 1) Τμήμα Επιστήμης Φυσικής αγωγής και Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η προτεινόμενη έρευνα θα είναι:

Ερευνητικό πρόγραμμα ☐ Μεταπτυχιακή διατριβή ☐ Διπλωματική εργασία ☐ Ανεξάρτητη έρευνα ☒

Τηλ. επικοινωνίας: 6977989041

Email επικοινωνίας: ajamurt@pe.uth.gr

Η Εσωτερική Επιτροπή Δεοντολογίας του Τ.Ε.Φ.Α.Α., Πανεπιστημίου Θεσσαλίας μετά την υπ. Αριθμ. 3-2/10-2-2016 συνεδρίασή της εγκρίνει τη διεξαγωγή της προτεινόμενης έρευνας.

Ο Πρόεδρος της
Εσωτερικής Επιτροπής
Δεοντολογίας – ΤΕΦΑΑ

Τσιόκανος Αθανάσιος
Αναπληρωτής Καθηγητής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Έντυπο συναίνεσης δοκιμαζόμενου σε ερευνητική εργασία

Επιστημονικός υπεύθυνος – επιβλέπων: Τζιαμούρτας Αθανάσιος

Τίτλος Μελέτης: Διερεύνηση και σύγκριση των προκαλούμενων με την οξεία άσκηση αλλαγών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) μετά τη συμπληρωματική λήψη λιποϊκού οξέος και N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC)

Εργαστήριο υλοποίησης της μελέτης: Κέντρο Έρευνας και αξιολόγησης της Απόδοσης, ΤΕΦΑΑ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να διερευνηθούν και να συγκριθούν οι προκαλούμενες με την οξεία άσκηση αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD μετά τη συμπληρωματική λήψη λιποϊκού οξέος και NAC. Επίσης να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ της συμπληρωματικής λήψης λιποϊκού οξέος, NAC και εικονικού συμπληρώματος.

Τα επίπεδα της γλουταθειόνης (ενδογενής αντιοξειδωτική ουσία) είναι πολύ χαμηλότερα σε αυτά τα άτομα σε σχέση με άτομα με φυσιολογικές τιμές δραστηριότητας του ενζύμου. Επομένως, υποθέτουμε ότι η συμπληρωματική λήψη ουσιών που αυξάνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (όπως είναι το λιποϊκό οξύ και η NAC) θα βελτιώσουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση σε αυτά τα άτομα, επιφέροντας θετικές συνέπειες σε δείκτες υγείας αλλά και στην απόδοση.

Διαδικασία μετρήσεων

Οι συμμετέχοντες θα επισκεφτούν το εργαστήριο πέντε φορές. Στην 1η επίσκεψη θα υπογραφεί η συναίνεση αφού γίνει ενημέρωση για τη διαδικασία, θα γίνουν οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις (ύψος, βάρος, ποσοστό λίπους) και φυσιολογικές μετρήσεις (καρδιακή συχνότητα ηρεμίας, αρτηριακή πίεση), καθώς και η δοκιμασία για προσδιορισμό της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO₂max) σε δαπεδοεργόμετρο.

Επίσης θα δοθούν στους συμμετέχοντες πλήρεις οδηγίες για τον τρόπο καταγραφής της διατροφής τους, ώστε να καταγράψουν αναλυτικά τι έφαγαν τις 2 ημέρες που θα

προηγηθούν πριν την επόμενη επίσκεψη στο εργαστήριο. Αυτό θα γίνει ώστε να επαναλαμβάνει ο κάθε συμμετέχοντας την ίδια διατροφή τις 2 ημέρες που θα προηγούνται πριν από κάθε επόμενη επίσκεψη.

Στη 2η επίσκεψη θα γίνουν φυσιολογικές μετρήσεις και λήψη αίματος, καθώς επίσης θα δοθεί λιποϊκό οξύ (600 mg/ημέρα) ή NAC (10mg/Kg σωματικού βάρους) ή εικονικό φάρμακο (κάψουλες με αλεύρι) σε επαρκή ποσότητα για 4 εβδομάδες. Μετά το πέρας των 4 εβδομάδων οι εθελοντές θα επανέλθουν στο εργαστήριο όπου θα γίνει η δεύτερη αιμοληψία και φυσιολογικές μετρήσεις. Θα υπάρξει μια περίοδος 2 ή 4 εβδομάδων όπου δεν θα γίνει κάποια παρέμβαση. Στη συνέχεια, οι εθελοντές θα επαναλάβουν την ίδια διαδικασία άλλη μια φορά για το άλλο σκευάσματα που πρέπει να λάβουν συμπληρωματικά. Η ουσία που λαμβάνουν σε κάθε περίπτωση οι συμμετέχοντες, θα είναι γνωστή μόνο σε έναν ερευνητή και θα αποκαλυφθεί μετά το τέλος και των βιοχημικών αναλύσεων (διπλή τυφλή μελέτη).

Κίνδυνοι και ενοχλήσεις

Αιμοληψία:

Θα χρησιμοποιηθεί μία μικρή βελόνα σύριγγας για τη λήψη φλεβικού αίματος από τη μεσοβασίλική φλέβα. Υπάρχει πιθανότητα μικρού μώλωπα στο σημείο της αιμοληψίας ενώ ο εθελοντής μπορεί να αισθανθεί πόνο κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας και ζαλάδα ή τάσεις λιποθυμίας τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά από την αιμοληψία. Σε κάθε δείγμα η συνολική ποσότητα αίματος που θα ληφθεί από έμπειρο γιατρό θα είναι 10ml η οποία δεν θα έχει απολύτως καμία αρνητική συνέπεια.

Δοκιμασία μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου:

Θα νιώσετε την φυσιολογική κόπωση που προκαλεί η υπομέγιστη άσκηση. Δεν υπάρχει κανένας κίνδυνος τραυματισμού κατά τη διάρκεια των δοκιμασιών. Παρ' όλα αυτά υπάρχει πρόβλεψη πρώτων βοηθειών και εκπαιδευμένο προσωπικό για κάθε ενδεχόμενο.

Προσδοκώμενες ωφέλειες

Τα ευρήματα από την εργασία θα δώσουν την δυνατότητα στους συμμετέχοντες να μάθουν ποιο είναι το ποσοστό του σωματικού λίπους, τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και την ποιότητα της διατροφής τους.

Δημοσίευση δεδομένων – αποτελεσμάτων

Η συμμετοχή σου στην έρευνα συνεπάγεται ότι συμφωνείς με τη δημοσίευση των δεδομένων και των αποτελεσμάτων της, με την προϋπόθεση ότι οι πληροφορίες θα είναι ανώνυμες και δε θα αποκαλυφθούν τα ονόματα των συμμετεχόντων. Τα δεδομένα που θα συγκεντρωθούν θα κωδικοποιηθούν με αριθμό, ώστε το όνομα σου δε θα φαίνεται πουθενά.

Πληροφορίες

Μη διστάσεις να κάνεις ερωτήσεις γύρω από το σκοπό ή/και τον τρόπο πραγματοποίησης της εργασίας. Αν έχεις κάποιες αμφιβολίες ή ερωτήσεις, ζήτησέ μας να σου δώσουμε πρόσθετες εξηγήσεις.

Ελευθερία συναίνεσης

Η άδειά σου να συμμετάσχεις στην εργασία είναι εθελοντική. Είσαι ελεύθερος να μην συναινέσεις ή να διακόψεις τη συμμετοχή σου όποτε επιθυμείς.

Διάβασα το έντυπο αυτό και κατανοώ τις διαδικασίες που θα εκτελέσω. Συναινώ να συμμετέχω στην εργασία.

Ημερομηνία: __/__/__

Ονοματεπώνυμο και
υπογραφή συμμετέχοντος

Υπογραφή ερευνητή

Ονοματεπώνυμο και
υπογραφή παρατηρητή

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Ερωτηματολόγιο υγείας

Ονοματεπώνυμο:

Ημερομηνία:

Παρακαλώ συμπληρώστε

1. Έχετε κάποιο πρόβλημα υγείας για το οποίο
 - A) είστε υπό φαρμακευτική αγωγή ναι [] όχι []
 - B) είστε υπό ιατρική παρακολούθηση ναι [] όχι []

2. Τα τελευταία 2 χρόνια, εξαιτίας κάποιας ασθένειας
 - A) επισκεφτήκατε το γιατρό σας ναι [] όχι []
 - B) επισκεφτήκατε εξωτερικά ιατρεία ναι [] όχι []
 - Γ) μέινετε στο νοσοκομείο ναι [] όχι []

3. Είχατε ποτέ κάποια από τις παρακάτω καταστάσεις;
 - A) Επιληψία ναι [] όχι []
 - B) Έκζεμα ναι [] όχι []
 - Γ) Διαβήτης ναι [] όχι []
 - Δ) Άσθμα ναι [] όχι []
 - E) Καρδιαγγειακά νοσήματα ναι [] όχι []
 - Z) Πεπτικά προβλήματα ναι [] όχι []
 - H) Προβλήματα γυναικολογικά ναι [] όχι []
 - Θ) Προβλήματα οστών και αρθρώσεων ναι [] όχι []
 - I) Προβλήματα ισορροπίας και συναρμογής ναι [] όχι []
 - K) Προβλήματα όρασης/ ακοής ναι [] όχι []
 - Λ) Προβλήματα θυρεοειδούς ναι [] όχι []
 - M) Ορμονικά προβλήματα ναι [] όχι []
 - N) Προβλήματα ήπατος και νεφρών ναι [] όχι []
 - Ξ) Μούδιασμα άκρων ναι [] όχι []
 - O) Άλλα προβλήματα ναι [] όχι []

4. Αν είστε γυναίκα

- | | | |
|--|---------|---------|
| A) σχεδιάζετε να μείνετε έγκυος | ναι [] | όχι [] |
| B) είστε η νομίζετε ότι είστε έγκυος | ναι [] | όχι [] |
| Γ) παίρνετε χάπια αντισύλληψης ή ορμόνες | ναι [] | όχι [] |
| Δ) είστε στην εμμηνόπαυση | ναι [] | όχι [] |

5. Κάποιος από τους συγγενείς πρώτου βαθμού είχε

- | | | |
|-----------------------------|---------|---------|
| A) Καρδιαγγειακά προβλήματα | ναι [] | όχι [] |
| B) Διαβήτη | ναι [] | όχι [] |
| Γ) Εγκεφαλικό | ναι [] | όχι [] |
| Δ) Κάποια άλλη ασθένεια | ναι [] | όχι [] |

6. Καπνίζετε αυτή την περίοδο

ναι [] όχι []

Έχετε καπνίσει ποτέ

ναι [] όχι []

Αν ναι, για πόσο καιρό κα πότε το κόψατε:

Πόσες μονάδες αλκοόλ πίνετε σε μια εβδομάδα:

7. Γυμνάζεστε

ναι [] όχι []

Πόσες φορές την εβδομάδα:

Αναφέρετε το είδος γυμναστικής:

Αν απαντήσατε ναι σε κάποια από τις ερωτήσεις, παρακαλώ περιγράψτε εν συντομία

.....

.....

.....

.....

.....

.....

☐ Δηλώνω ότι είμαι σωματικά υγιής και δεν πάσχω από κάποια πάθηση, βλάβη, ασθένεια ή αναπηρία που θα μπορούσε να εμποδίσει τη συμμετοχή μου στην πειραματική διαδικασία.

☐ Αναγνωρίζω ότι έχω εξετασθεί και ο γιατρός μου έχει δώσει την άδεια να συμμετάσχω, ή έχω αποφασίσει να συμμετάσχω στην πειραματική διαδικασία χωρίς την έγκριση του γιατρού μου. Αναλαμβάνω κάθε ευθύνη για την συμμετοχή μου.

Ημ/νία

___/___/___

Υπογραφή ερευνητή

Υπογραφή συμμετέχοντα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Ερωματηματολόγιο Φυσικής Δραστηριότητας (ΙΡΑQ)

Παρακάτω ακολουθούν ερωτήσεις σχετικά με την άσκηση που κάνεις στον ελεύθερο χρόνο σου

Σκέψου το χρόνο που αφιέρωσες στο διάστημα των τελευταίων 7 ημερών για να ασκηθείς στον ελεύθερο χρόνο σου. Σκέψου μόνο τις φορές που έκανες άσκηση για τουλάχιστον 10 λεπτά κάθε φορά.

1. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες ημέρες έκανες στον ελεύθερο χρόνο σου άσκηση υψηλής έντασης (ανέπνεες πολύ πιο δύσκολα από ότι συνήθως), όπως προπόνηση με βάρη, γρήγορη ποδηλασία, τρέξιμο, αθλοπαιδιές (π.χ., ποδόσφαιρο, μπάσκετ)

_____ **ημέρες ανά εβδομάδα**

☐ Καμία έντονη άσκηση → **προχωρήστε στην ερώτηση 3**

2. Πόσο χρόνο συνήθως αφιέρωσες για να κάνεις άσκηση υψηλής έντασης σε μία από αυτές τις ημέρες;

_____ **ώρες την ημέρα ή**

_____ **λεπτά την ημέρα**

3. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες μέρες έκανες στον ελεύθερο χρόνο σου άσκηση μέτριας έντασης (ανέπνεες λίγο πιο δύσκολα από ότι συνήθως), όπως κολύμπι, ποδηλασία σε κανονικό ρυθμό, γρήγορο περπάτημα. Σκέψου μόνο τις φορές που έκανες άσκηση για τουλάχιστον 10 λεπτά. Μην συμπεριλάβεις το περπάτημα.

_____ **ημέρες ανά εβδομάδα**

☐ Καμία άσκηση μέτριας έντασης → **προχωρήστε στην ερώτηση 5**

4. Πόσο χρόνο συνήθως αφιέρωσες για να κάνεις άσκηση μέτριας έντασης σε μία από αυτές τις ημέρες;

_____ ώρες την ημέρα ή

_____ λεπτά την ημέρα

☐ Δεν γνωρίζω/ Δεν είμαι σίγουρος/η

5. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες ημέρες έκανες στον ελεύθερο χρόνο σου περπάτημα για τουλάχιστον 10 λεπτά;

_____ ημέρες ανά εβδομάδα

☐ Καθόλου περπάτημα

6. Πόσο χρόνο συνήθως αφιέρωσες περπατώντας σε μία από αυτές τις ημέρες;

_____ ώρες την ημέρα ή

_____ λεπτά την ημέρα

☐ Δεν γνωρίζω/ Δεν είμαι σίγουρος/η

7. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσο χρόνο καθίσατε σε μια συνηθισμένη ημέρα της εβδομάδας;

_____ ώρες την ημέρα ή

_____ λεπτά την ημέρα

☐ Δεν γνωρίζω/ Δεν είμαι σίγουρος/η